



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 46 874 A 1**

⑦① Aktenzeichen: 197 46 874.8
⑦② Anmeldetag: 23. 10. 97
⑦③ Offenlegungstag: 29. 4. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06
C 07 H 1/08
G 01 N 33/50
G 01 N 30/00

DE 197 46 874 A 1

⑦① Anmelder:
QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

⑦④ Vertreter:
Diehl, Glaeser, Hiltl & Partner, 80333 München

⑦② Erfinder:
Bastian, Helge, Dr., 40597 Düsseldorf, DE; Gauch,
Simone, 40597 Düsseldorf, DE; Oelmüller, Uwe, Dr.,
40699 Erkrath, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:
EP 08 19 696 A2
EP 05 80 305 A2
WO 9 78 306 A1
Qiagen Product Guide 1996 R.Egerer
"Chromatogra-
phic Methods in Biotechnology", in "Biotechnolo-
gy Focus", eds. Finn, R.K., Präve, P., Hauser
Publishers Munich 1988, S.112-114;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen - insbesondere unter Verwendung hydrophober Membranen
- ⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren unter Verwendung hydrophober Oberflächen, insbesondere unter Verwendung hydrophober Membranen.

DE 197 46 874 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen unter Verwendung hydrophober Membranen oder Membranen mit hydrophobisierter Oberfläche.

Die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen und klinischen Probenmaterialien ist von essentieller Bedeutung für Arbeitsbereiche, in denen Nukleinsäure-basierende Arbeitstechniken angewendet werden und in die Nukleinsäure-basierende Techniken gerade Einzug halten. Hierzu zählen zum Beispiel die Vaterschaftsanalyse, Gewebetypisierungen, Identifizierung von Erbkrankheiten, Genomanalyse, molekulare Diagnostik, Bestimmung von Infektionskrankheiten, Tier- und Pflanzenzucht, transgene Forschung, Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Biologie und der Medizin sowie zahlreiche verwandte Arbeitsgebiete. Dabei besteht eine generelle Schwierigkeit darin, biologische bzw. klinische Probenmaterialien so aufzubereiten, daß die in ihr enthaltenen Nukleinsäuren direkt in die jeweilige Analysenmethode eingesetzt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind bereits zahlreiche Verfahren zur Reinigung von DNA bekannt. So ist es bekannt, Plasmid-DNA beispielsweise zum Zwecke des Klonierens oder auch für andere experimentelle Vorhaben nach dem Verfahren von Birnboim [Methods in Enzymology 100 (1983) 243] zu reinigen. Nach diesem Verfahren wird ein geklärtes Lysat bakteriellen Ursprungs einem Caesiumchlorid Gradienten ausgesetzt und über einen Zeitraum von 4 bis 24 Stunden zentrifugiert. Diesem Verfahrensschritt folgt gewöhnlicherweise die Extraktion und die Präzipitation der DNA. Dieses Verfahren ist mit dem Nachteil verbunden, daß zum es einen apparativ sehr aufwendig und auf der anderen Seite sehr zeitaufwendig, kosten intensiv und nicht automatisierbar ist.

Andere Methoden, bei denen geklärte Lysate eingesetzt werden um DNA zu isolieren bestehen in der Ionenaustauschchromatographie [Colpan et al., J. Chromatog. 296 (1984) 339] und in der Gelfiltrationsmethode. [Moreau et al. Analyt. Biochem. 166 (1987) 188]. Diese Verfahren bieten sich in erster Linie als Ersatz für den Caesiumchlorid-Gradienten an, machen aber ein aufwendiges System für die Lösungsmittelversorgung sowie die Präzipitation der so gewonnenen DNA-Fractionen erforderlich, da sie gewöhnlicherweise Salze enthalten und sehr verdünnte Lösungen darstellen.

Marko et al. [Analyt. Biochem. 121 (1982) 382] sowie Vogelstein et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615] erkannten, daß, falls die DNA aus Nukleinsäureenthaltenden Extrakten hohen Konzentrationen von Natriumiodid oder Natriumperechlorat ausgesetzt wird, die DNA allein nur an mechanisch fein zerkleinerten Glasscintillationsröhrchen sowie zerkleinerten Glasfasermembranen bzw. Glasfaserplatten bindet, während RNA und Proteine nicht binden. Die so gebundene DNA kann ggf. mit Wasser eluiert werden.

Aus den verschiedenen Lehren, die im Stand der Technik offenbart sind, geht ferner ganz allgemein hervor, daß alle Nukleinsäurereinigungsverfahren, die auf dem Prinzip der Festphasenextraktion beruhen, auf die Verwendung von hydrophilen Oberflächen zurückgreifen – wie modifizierte Silica-Materialien – (beispielsweise DEAE-Anionenaustauscherchromatographie, Silica-Membranen oder Silica-Partikel).

Im Stand der Technik wird im allgemeinen darauf hingewiesen, daß die Oberflächen unbedingt einen hydrophilen Charakter aufweisen müssen – wie dies z. B. bei Silicagel der Fall ist – um für die Immobilisierung von Nukleinsäuren tauglich zu sein. Dagegen findet sich im Stand der Technik lediglich ein Hinweis auf die Verwendung hydrophober Oberflächen.

So wird in der WO-A-87/06621 die Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer PVDF-Membran beschrieben. Allerdings werden die an die PVDF-Membran gebundenen Nukleinsäuren anschließend nicht eluiert, sondern die Membran wird samt gebundener Nukleinsäuren direkt in einen PCR-Ansatz eingebracht. Letztendlich wird in dieser internationalen Patentanmeldung und in der weiteren Literatur jedoch die Lehre offenbart, daß hydrophobe Oberflächen bzw. Membranen im allgemeinen zuvor mit Wasser oder Alkohol benetzt werden müssen, um die Nukleinsäuren in halbwegs befriedigenden Ausbeuten immobilisieren zu können.

Für eine Reihe von modernen Applikationen – wie z. B. der PCR-, der Reversed-Transcription-PCR, SunRise, LCX-branched-DNA, NASBA, oder TaqMan-Technologie und ähnlichen Echtzeitquantifizierungsverfahren für PCR – ist es auf der anderen Seite jedoch absolut notwendig, die Nukleinsäuren direkt von der festen Phase lösen zu können. Hierzu ist der WO-A-87/06621 diejenige Lehre zu entnehmen, daß die Nukleinsäure zwar von den dort eingesetzten Membranen wiedergewonnen werden kann, daß diese Wiedergewinnung jedoch sehr problematisch ist und bei weitem nicht zur quantitativen Isolierung von Nukleinsäuren geeignet ist. Daneben fallen die so gewonnenen Nukleinsäuren in vergleichsweise sehr hoher Verdünnung an – ein Umstand, der weitere Folgeschritte zwecks Konzentrierung und Isolierung zwangsläufig erforderlich macht.

Aus den oben genannten Gründen stellen die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren – insbesondere im Hinblick auf eine Automatisierung des Verfahrensablaufs zur Nukleinsäuregewinnung – keinen geeigneten Ausgangspunkt für eine verfahrenstechnisch möglichst einfache und quantitative Isolierung von Nukleinsäuren dar.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren zu überwinden und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches dazu geeignet ist, ohne erheblichen technischen Mehraufwand weitgehend vollautomatisch durchgeführt werden zu können.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht insbesondere darin, Nukleinsäuren an eine immobile Phase – insbesondere an eine Membran in der Art und Weise zu binden, daß sie in einem folgenden Reaktionsschritt ohne weiteres wieder von dieser Phase abgelöst werden kann und ggf. in weiteren Anwendungen – wie z. B. Restriktionsverdauung, RT, PCR, RT-PCR oder beispielsweise auch NASBA oder in jedweder anderen oben genannten geeigneten Analyse- bzw. Enzymreaktion eingesetzt werden können.

Gelöst werden die vorgenannten Aufgaben erfindungsgemäß durch die Verwendung von porösen hydrophoben Membranen, an welche die Nukleinsäuren auf einfache Weise aus der die Nukleinsäuren enthaltenden Probe gebunden und mittels ebenso einfacher Verfahrensschritte wieder abgelöst werden können, wobei es die erfindungsgemäß einfache Prozeßführung ermöglicht, das Verfahren insbesondere vollautomatisch durchführen zu können.

Dabei wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure enthaltende Probe durch eine Probe bzw. Probenansatz definiert, die bzw. der Nukleinsäuren enthält, die als geeignete Edukte für in vitro Transkriptionen, PCR-Reak-

tionen, NASBA-Reaktionen oder cDNA-Synthesen dienen können – wie z. B.: Plasma, Körperflüssigkeiten – wie beispielsweise Blut, Sputum, Urin, Faeces –, Zellen, Serum, Abstriche, Gewebeproben jeder Art, Pflanzen und Pflanzenteile, Bakterien, Viren, Hefen etc., wie beispielsweise sie in der Europäischen Patentanmeldung Nr.: 95909684.3 offenbart sind, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird – oder auch freie Nukleinsäuren.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nimmt man die oben beschriebene Nukleinsäuren enthaltende Probe in einer Lösung auf, die geeignete Salze und/oder Alkohol(e) enthält, anschließend ggf. den Ansatz aufschließt und mischt und die so erhaltene Mischung mittels eines Vakuums, auf dem Wege einer Zentrifugation, mittels Überdruck oder durch Kapillarkräfte über eine hydrophobe Membran führt.

Als Salze für das Immobilisieren von Nukleinsäuren an hydrophoben Membranen kommen Salze von Alkali- oder Erdalkalimetallen mit Mineralsäuren in Frage; insbesondere Alkali- oder Erdalkalihalogenuide bzw. -sulfate worunter die Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat besonders bevorzugt werden.

Ferner sind zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Salze von ein- oder mehrbasischen oder auch polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkali- oder Erdalkalimetallen geeignet. Darunter fallen insbesondere Salze des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren – wie z. B. Oxal-, Malon- oder Bernsteinsäure – oder mit Hydroxy- bzw. Polyhydroxycarbonsäuren – wie z. B. bevorzugterweise mit Zitronensäure.

Als besonders zweckmäßig hat sich dabei der Einsatz von sog. chaotropen Agenzien herausgestellt. Chaotrope Substanzen sind in der Lage die dreidimensionale Struktur der Wasserstoffbrückenbindung zu stören. Hierdurch werden – wie allgemein bekannt ist – auch die intramolekularen Bindungskräfte geschwächt, die bei der Ausbildung der räumlichen Strukturen – wie z. B. Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstrukturen – bei biologischen Molekülen beteiligt sind. Derartige chaotrope Agenzien sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt [Römpf, Lexikon der Biotechnologie, Herausgeber: H. Dellweg R.D. Schmid u. W.E. Fromm, Thieme Verlag, Stuttgart 1992].

Als bevorzugte chaotrope Substanzen gelten gemäß der vorliegenden Erfindung beispielsweise Salze aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid und Harnstoff.

Die chaotropen Substanzen werden dabei in 0.01 bis 10 molarer wässriger Lösung, bevorzugt in 0.1 bis 7 molarer wässriger Lösung und besonders bevorzugt in 0.2 bis 5 molarer wässriger Lösung eingesetzt. Hierbei können die vorbezeichneten chaotropen Agenzien allein oder in Kombinationen verwandt werden. Insbesondere werden – insbesondere werden 0.01 bis 10 molare wässrige Lösungen, bevorzugt 0.1 bis 7 molare wässrige Lösungen und besonders bevorzugt in 0.2 bis 5 molare wässrige Lösungen von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid eingesetzt.

Als Alkohole kommen für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst alle Hydroxylderivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen in Betracht. Dabei ist es zunächst unerheblich ob diese Verbindung eine, zwei, drei oder mehr Hydroxylgruppen – wie mehrwertige C₁-C₃-Alkanole, beispielsweise Ethylenglykol, Propylenglykol oder Glycerin – enthalten.

Daneben zählen ebenfalls die Zuckerabkömmlinge – die sog. Aldite – wie auch die Phenole – beispielsweise Polyphenole – zu den erfindungsgemäß einsetzbaren Alkoholen.

Unter den vorgenannten Hydroxyverbindungen werden die C₁-C₃-Alkanole – wie Methanol, Ethanol, n-Propanol, tert.-Butanol und die Pentanole besonders bevorzugt.

Als hydrophob gelten im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Stoffe bzw. Membranen, die von ihrem chemischen Charakter her nicht in Wasser eindringen – bzw. vice versa – darin bleiben zu vermögen.

Unter hydrophober Oberfläche – vorzugsweise Membran – wird im Sinne der vorliegenden Erfindung jede mikroporöse Trennschicht verstanden, die einen hydrophoben Charakter aufweist. Im Falle einer Membran wird die hydrophobe Oberfläche durch eine Folie aus einem polymeren Material gebildet, wobei das Polymer vorzugsweise polare Gruppen, wie z. B. Ester- bzw. Carbonyl- oder Amid-Gruppen aufweist. Auf der anderen Seite ist es denkbar, die polare Gruppe mit der Aufbringung des Hydrophobierungsmittels auf eine Oberfläche aufzubringen, die per se keine polare Gruppen aufweist, falls dies gewünscht ist.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt der Begriff Oberfläche im weiteren Sinne auch eine Schicht von Partikeln bzw. auch ein Granulat sowie auch Fasern mit hydrophoben Eigenschaften, die aus den ursprünglich die Membranen aufbauenden Materialien bestehen.

Als bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung gelten Membranen die aus einem hydrophilen Grundmaterial bestehen und die durch eine entsprechende chemische Nachbehandlung, die an sich aus dem Stand der Technik bekannt ist – hydrophobisiert wurden, wie z. B. hydrophobisierte Nylon-Membranen, die kommerziell erhältlich sind.

Unter hydrophobisierten Membranen werden erfindungsgemäß allgemein solche Membranen verstanden, die als unter Umständen ursprünglich hydrophile Membran mit dem unten erwähnten Hydrophobierungsmitteln überzogen wurden. Derartige Hydrophobierungsmittel überziehen hydrophile Substanzen mit einer dünnen Schicht hydrophober Gruppen, wozu beispielsweise längere Alkylketten oder Siloxangruppen gehören. Geeignete Hydrophobierungsmittel sind aus dem Stand der Technik in großer Zahl bekannt und stellen erfindungsgemäß Paraffine, Wachse, Metallseifen etc. ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartäre organische Verbindungen, Harnstoffderivate, feststoffmodifizierte Melaminharze, Silicone, zinkorganische Verbindungen Glutardialdehyde und ähnliche Verbindungen dar.

Daneben gelten als erfindungsgemäß einsetzbare hydrophobe Membranen, solche Membranen, die hydrophobisiert sind und deren Grundmaterial polare Gruppen aufweisen kann. Gemäß dieser Kriterien eignen sich beispielsweise – insbesondere hydrophobisierte – Materialien aus der folgenden Gruppe für den erfindungsgemäßen Einsatz: Nylon, Polysulfone, Polyethersulfone, Polycarbonate, Polyacrylate sowie Acrylsäurecopolymere, Polyurethane, Polyamide, Polyvinylchlorid, Fluorocarbonate, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylendifluorid, Ethylentetrafluoroethylen, Polyethylenchlorotrifluoroethylen-Copolymerisate oder Polyphenylensulfid sowie Cellulose und Cellulose-Mischester oder Nitro-cellulosen wie auch hydrophobisierte Glasfasermembranen, worunter hydrophobisierte Nylon-Membrane besonders bevorzugt sind.

Die Membranen, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, haben dabei beispielsweise einen Porendurchmesser von 0.05 bis 20 µm, vorzugsweise 0.2 bis 5 µm und besonders bevorzugt 0.45 bis 5.0 µm.

Als Waschpuffer kommen ebenfalls die oben beschriebenen Salze oder Alkohole bzw. Phenole oder Polyphenole in Frage. Die Temperaturen liegen im Waschschrift üblicherweise in einem Intervall von 10 bis 30°C, wobei auch höhere Temperaturen erfolgreich angewandt werden können.

Zur Elution der gebundenen Nukleinsäure eignen sich erfindungsgemäß Wasser oder wässrige Salzlösungen als Elutionsmittel. Als Salzlösungen werden Pufferlösungen eingesetzt, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) in einer Konzentration von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter, bevorzugt 0.01 bis 0.2 Mol/Liter, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare Lösungen. Daneben werden bevorzugt wässrige Lösungen von Alkali- oder Erdalkalimetallsalzen – insbesondere deren Halogenide – eingesetzt, worunter 0.001 bis 0.5 – bevorzugt 0.01 bis 0.2 molare, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare wässrige Lösungen von Natriumchlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid oder Magnesiumdichlorid. Daneben können bevorzugt auch Lösungen von Salzen der Alkalimetalle oder Erdalkalimetalle mit Carbon- oder Dicarbonsäuren – Oxalsäure oder Essigsäure – in dem zuvor genannten Konzentrationsbereich eingesetzt werden, wie z. B. 0.001 bis 0.5 molare – bevorzugt 0.01 bis 0.2 molare, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.05 molare Lösungen von Natriumacetat oder -oxalat in Wasser.

Ganz besonders wird Wasser als Elutionsmittel bevorzugt.

Die Elution kann erfindungsgemäß mittels Überdruck, Vakuum Zentrifugation oder durch Kapillarkräfte erfolgen.

Hinsichtlich der einzelnen Schritte wird das erfindungsgemäße Verfahren wie folgt durchgeführt:

Das Lysat der zur Gewinnung der Nukleinsäuren dienenden Probe oder die ursprünglich freie(n) Nukleinsäure(n) wird/werden beispielsweise in eine (Plastik-)Säule pipettiert, in der – beispielsweise auf dem Boden – die hydrophobe Membran fixiert wird. Zweckmäßigerweise kann die Membran auf einer Fritte fixiert werden, die als mechanische Unterstützung dient. Anschließend wird das Lysat durch die Membran geführt, was durch Anlegen eines Vakuums am Ausgang der Säule erreicht werden kann. Auf der anderen Seite kann der Transport durch einen Lysat-seitigen Überdruck erfolgen. Daneben kann – wie schon zuvor erwähnt – der Lysattransport auf dem Wege der Zentrifugation oder durch die Einwirkung von Kapillarkräften bewerkstelligt werden; letzteres kann zum Beispiel mit einem schwammartigen Material geschehen, das unterhalb der Membran mit dem Lysat bzw. Filtrat in Kontakt gebracht wird.

Der Vorteil einer derartigen Anordnung besteht in einer einfachen, sicheren und bequemen Möglichkeit der Filtrat-Entsorgung – es muß in diesem Fall nur der Schwamm, der nunmehr mit dem Filtrat mehr oder weniger vollgesogen ist, ausgetauscht werden. Es wird an dieser Stelle deutlich daß die Säule kontinuierlich oder auch batch-weise betrieben werden kann und, daß beide Betriebsarten vollautomatisiert durchgeführt werden können, bis die hydrophobe Membran mit Nukleinsäure gesättigt ist. Im letzten Schritt erfolgt die Elution der Nukleinsäure, welche beispielsweise von der Membran abpipettiert bzw. abgehoben oder auch durch die Membran oder durch die oben erwähnte Schicht aus Partikeln, Granulat oder Fasern aus hydrophoben Membranmaterialien durchgesogen, durchgedrückt oder durchzentrifugiert werden kann.

Das Auffangen von Fraktionen, welche in großer Verdünnung die gewünschten Nukleinsäuren enthalten und eine anschließende Konzentrierung erfordern, entfallen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren völlig – vielmehr fallen die gewünschten Nukleinsäuren in schwach oder nicht-salzhaltigen Lösungen in sehr kleinen Volumina an, was von großem Vorteil für alle molekularbiologischen Analyseverfahren ist, da hier gewünscht ist, reine Nukleinsäuren in möglichst kleinen Volumina bei gleichzeitig hoher Konzentration einzusetzen.

Daneben kann auch der letzte Verfahrensschritt – wie auch die Vorbereitung der erfindungsgemäßen Membran bzw. der Säule für die nächste Nukleinsäureisolation – leicht vollautomatisiert erfolgen, da die abschließend eluierten Nukleinsäuren von oben von der Membran abgesaugt bzw. abpipettiert werden können.

Ferner bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß das über der Membran befindliche Volumen als Reaktionsraum genutzt werden kann. So ist es z. B. möglich, nach dem Isolieren und Eluieren der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Nukleinsäuren, diese einer molekularbiologischen Applikation – wie Restriktionsverdauung, RT, PCR, RT-PCR, NASBA oder Enzymreaktionen – zu unterwerfen, die aus diesen Reaktionen hervorgehenden Nukleinsäuren gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erneut an die hydrophobe bzw. hydrophobisierte Membran zu binden, wie beschreiben zu waschen und anschließend zu eluieren, zu isolieren, bzw. zu analysieren, beispielsweise mittels Spektroskopie, Fluorometrie oder ähnlichen Meßverfahren.

Die vorbeschriebene Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert. Verschiedenartige, andere Ausgestaltungen der Verfahren werden für den Fachmann aus der vorstehenden Beschreibung und den Beispielen ersichtlich. Es wird jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß diese Beispiele und die diesen zugeordnete Beschreibung lediglich zum Zweck der Erläuterung vorgesehen und nicht als Einschränkung der Erfindung anzusehen sind.

Beispiel 1

Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

In einer Plastiksäule werden kommerziell erhältliche hydrophobe Nylon-Membranen (Beispielsweise ein Material der Fa. MSI: Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm oder ein Material der Fa. Pall GmbH: Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm), die durch chemische Nachbehandlung hydrophobisiert wurden, einlagig eingebracht. Die Membranen werden auf einer Polypropylenfritte, die als mechanische Unterstützung dient, plaziert. Die Membranen werden in der Plastiksäule durch einen Spannung fixiert.

Die so vorbereitete Säule wird über eine Luerverbindung mit einer Vakuumkammer verbunden – alle Isolierungsschritte werden mit Hilfe eines angelegten Vakuums durchgeführt.

Zur Isolierung werden 5×10^5 HeLa-Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellen werden durch Zugabe von 150 µl eines handelsüblichen Guanidiniumiso-thiocyanat-Puffer – wie z. B. RLT-Puffer der Fa. Qiagen – auf an sich aus dem Stand der Technik bekannte Weise lysiert. Dabei wird die Lyse durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s unterstützt. Anschließend werden 150 µl 70%-iges Ethanol zugefügt und durch

Auf- und Abpipettieren oder durch vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt.

Das Lysat wird anschließend in die Plasticsäule pipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den so eingestellten Bedingungen bleibt die RNA an der Membran gebunden. Anschließend wird mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-isothiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Fa. Qiagen - und danach mit einem zweiten Tris-haltigen bzw. TRIS- und alkoholhaltigen Waschpuffer - z. B. mit dem Puffer RPI der Fa. Qiagen - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Nach dem letzten Waschschritt wird das Vakuum über einen Zeitraum von ca. 10 min aufrechterhalten, um die Membran zu trocknen. Danach wird die Vakuumkammer belüftet.

Zur Elution werden 70 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Nach einer Inkubation über einen Zeitraum von 1 min bei einer Temperatur im Bereich von 10 bis 30°C wird das Eluat mittels einer Pipette von oben von der Membran abpipettiert und der Elutionsschritt wird zum Zweck einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird anschließend durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt (vgl. Fig. 1: Total-RNA über Hydrolon 1.2 isoliert).

Die Ergebnisse der zwei Isolierungen mit hydrophoben Nylonmembranen (Nr. 1 und 2) sind in der nachfolgenden Tabelle 1 Vergleichsversuche, in denen zum einen hydrophiles Nylon (Nyaflo) (Nr. 3) sowie eine Silica-Membran eingesetzt wurde (Nr. 4), gegenübergestellt. Die dort wiedergegebenen Werte liefern einen überzeugenden Beleg für die beeindruckende Isolierungsleistung sowie Trennwirkung der erfindungsgemäß eingesetzten hydrophoben Materialien.

Tabelle 1

RNA-Ausbeute und -Reinheit der nach Beispiel 1 isolierten Total-RNA

Nr	Membrantypus	Ausbeute an Gesamt- RNA [µg]	E ₂₆₀ /E ₂₈₀
1	Magna SH 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	6,0	1.97
2	Hydrolon 1,2 µm (hydrophobes Nylon)	7,1	2,05
3	Nyaflo (hydrophiles Nylon)	< 0,2	nicht bestimmt
4	Hydrophile Silica-Membran	< 0,2	nicht bestimmt

Die isolierte RNA kann ferner auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert werden. Hierzu werden beispielsweise 1.2%-ige Formaldehyd-Agarose-Gele angefertigt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 wiedergegeben.

In Fig. 2 verkörpert Spur 1 eine Total RNA, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Magna SH mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

Spur 2 stellt eine Total RNA dar, die über eine hydrophobe Nylon-Membran des Ursprungs Hydrolon mit einem Porendurchmesser von 1,2 µm isoliert wurde.

Spur 3 stellt das Chromatogramm einer Total RNA dar, die über eine Silica-Membran isoliert wurde.

Dabei wurden jeweils 50 µl der Total-RNA Isolate analysiert.

Fig. 2 liefert einen deutlichen Beleg dafür, daß unter Verwendung der Silica-Membran kein meßbarer Anteil an Total-RNA isoliert werden kann.

Beispiel 2

Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausleber

Bei diesem Beispiel werden Lysat und Waschlösungen mittels Zentrifugation über die hydrophobe Membran geführt und die RNA durch Abnehmen des Überstandes von oben eluiert.

5 mg bei -80°C tiefgefrorene Mausleber werden in ein mit 350 µl eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-isothiocyanat enthaltenden Lysepuffers (beispielsweise Puffer RLT der Fa. Qiagen) gefülltes 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mittels eines elektrischen Homogenisators über einen Zeitraum von 30 s homogenisiert. Anschließend werden 350 µl 70%-iges Ethanol zu dem Lysat gegeben und durch Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von 5 s gemischt. Drei derartige Lysate werden anschließend jeweils in eine Plasticsäulen enthaltend eine hydrophobe Nylon-Membran vom Typ Magna SH 1.2 µm, eine hydrophobe Nylon-Membran vom Typ Hydrolon und - als Vergleichsversuch - Glasfasermembran (hydrophiles Silica), die sich in einem 2ml Auffanggefäß befinden, pipettiert. Das Lysat wurde jeweils durch Zentrifugation über einen Zeitraum von 15 s bei 10.000 x g durch die Membran geführt.

wobei die RNA gemäß den in Tabelle 2 wiedergegebenen Werten an den Membranen haften blieb.

Der Durchbruch wird jeweils verworfen und die Säule erneut im Auffanggefäß plaziert. Anschließend werden die Membranen einmal mit einem kommerziell erhältlichen TRIS- und Ethanol-haltigen Waschpuffer (beispielsweise Puffer RW1 der Fa. Qiagen) gewaschen sowie zweimal mit einem weiteren kommerziell erhältlichen Guanidinium-iso-thiocyanat enthaltenden Waschpuffer (beispielsweise Puffer RPE der Fa. Qiagen) gewaschen, wobei der Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation durch die Membran geführt wird und der letzte Waschschritt bei $18.000 \times g$ über einen Zeitraum von 2 min Zentrifugationszeit durchgeführt wird, um die Membran zu trocknen.

Zur Elution werden 70 μ l RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran zu lösen. Nach einer Inkubation über einen Zeitraum von einer Minute bei $10-30^{\circ}\text{C}$ werden die Eluate von oben – d. h.: vom Überstand auf der Membran mittels einer Pipette entnommen. Der Elutionsschritt wurde noch einmal wiederholt.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wurde durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. – Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung der Verhältnisse der Lichtabsorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt.

Tabelle 2

RNA-Ausbeute und -Reinheit der nach Beispiel 2 isolierten Gesamt-RNA

Nr	Membrantypus	Ausbeute an Gesamt- RNA [μ g]	E ₂₆₀ /E ₂₈₀
1	Magna SH 1,2 μ m (hydrophobes Nylon)	15	1.92
2	Hydrolon 1,2 μ m (hydrophobes Nylon)	14	2,05
3	Glasfasermembran (hydrophiles Silica)	1.7	nicht bestimmt

Beispiel 3

Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische. Bei diesem Beispiel werden Lysat und Waschlösungen durch Anlegen eines Vakuums über die hydrophobe Membran geführt.

In Plastiksäulen, die mit einer Vakuumkammer in Verbindung stehen, werden hydrophobe Nylon-Membranen (beispielsweise Hydrolon 1.2 mm der Fa. Pall) analog Beispiel 1 eingebracht.

100 μ l einer Gesamt-RNA enthaltenden wässrigen Lösung werden jeweils mit 350 μ l eines kommerziell erhältlichen Guanidinium-iso-thiocyanat enthaltenden Lysepuffers (beispielsweise Puffer RLT der Fa. Qiagen), 350 μ l 1.2 M Natriumacetat-Lösung, 350 μ l 2 M Natriumchlorid-Lösung, 350 μ l 4 M Lithiumchlorid-Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend werden jeweils 250 μ l Ethanol zugegeben und ebenfalls durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die RNA-haltigen Lösungen werden danach in die Plastiksäulen einpipettiert und durch Evakuierung der Vakuumkammer durch die Membran gesaugt. Unter den beschriebenen Bedingungen bleibt die RNA an den Membranen gebunden. Die Membranen werden anschließend – wie in Beispiel 1 beschrieben – gewaschen.

Abschließend wird die RNA – ebenfalls wie in Beispiel 1 beschrieben – von oben – von der Membran mittels einer Pipette entnommen.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei 260 nm ermittelt. – Die Qualität der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung der Verhältnisse der Lichtabsorption bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt.

Tabelle 3

Isolierung freier RNA durch Bindung der RNA an hydrophobe Membranen mittels verschiedener Salz/Alkohol-Gemische

Nr	Salz/Alkohol-Gemisch	Ausbeute an Gesamt- RNA [μ g]	E ₂₆₀ /E ₂₈₀
1	RLT-Puffer Qiagen	9.5	1.92
2	0.6 M Natriumacetat / 35 %-iges Ethanol	8.5	1.98
3	1.0 M Natriumchlorid / 35 %-iges Ethanol	7.9	1.90
4	2 M Lithiumchlorid / 35 %-iges Ethanol	4.0	2.01

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren an hydrophoben Oberflächen, **dadurch gekennzeichnet** daß es folgende Schritte umfaßt:
 - Immobilisieren der Nukleinsäuren an einer hydrophoben Oberfläche
 - gegebenenfalls Waschen der immobilisierten Nukleinsäure mit einem Waschpuffer
 - Ablösen der immobilisierten Nukleinsäure von der Oberfläche
 - ggf. Eluieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Oberfläche eine Membran ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß hydrophobe Membran aus einem Polymer mit polaren Gruppen aufgebaut ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen der Alkali- oder Erdalkalimetalle mit Mineralsäuren eingesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Alkali- oder Erdalkalihalogenide oder -sulfate eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Halogenide des Natriums oder Kaliums oder Magnesiumsulfat eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen von ein- oder mehrbasischen oder polyfunktionellen organischen Säuren mit Alkali- oder Erdalkalimetallen eingesetzt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen des Natriums, des Kaliums oder des Magnesiums mit organischen Dicarbonsäuren eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Dicarbonsäure Oxalsäure, Malonsäure und/oder Bernsteinsäure ist.
10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren wässrige Lösungen von Salzen des Natriums oder des Kaliums mit einer Hydroxy- oder Polyhydroxycarbonsäure eingesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Polyhydroxycarbonsäure Zitronensäure ist.
12. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren ggf. zusätzlich chaotrope Agenzien eingesetzt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agenz ein Salz aus der Gruppe der Trichloracetate, Thiocyanate, Perchlorate, Jodide oder Guanidin-Hydrochlorid, Guanidin-iso-thiocyanat oder Harnstoff ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß 0.01 molare bis 10 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß 0.1 molare bis 7 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß 0.2 molare bis 5 molare wässrige Lösungen der chaotropen Agenzien allein oder in Kombination mit anderen Salzen zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-16, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung von Natriumperchlorat, Guanidinium-Hydrochlorid, Guanidinium-iso-thiocyanat, Natriumiodid und/oder Kaliumiodid zum Immobilisieren der Nukleinsäuren eingesetzt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nukleinsäuren Hydroxyl-
derivate von aliphatischen oder acyclischen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxylderivate C₁-C₅-Alkanole eingesetzt
werden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als C₁-C₅-Alkanole Methanol, Ethanol, n-Propanol,
tert.-Butanol und/oder Pentanole eingesetzt werden.
21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Hydroxylderivat ein Aldit eingesetzt wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren der Nuklein-
säuren ein Phenol oder Polyphenol eingesetzt wird.
23. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Immobilisieren von Nukleinsäuren hydro-
phile Membranen mit einer hydrophobisierten Oberfläche eingesetzt werden.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophile Oberfläche oder
die Membran aus Nylon, einem Polysulfon, Polyethersulfon, Polycarbonat, Polyacrylat sowie einem Acrylsäureco-
polymeren, Polyurethan, Polyamid, Polyvinylchlorid, Fluorocarbonat, Polytetrafluoroethylen, Polyvinylendifluo-
rid, Ethylentetrafluoroethylen, einem Polyethylenchlorotrifluoroethylen-Copolymerisat oder Polyphenylensulfid be-
steht.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß Oberfläche oder die Membran aus einem hydropho-
bisierten Nylon besteht.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 23-25, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran mit einem Hydropho-
biemittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsal-
zen, quartären organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, Silicone, zinkor-
ganischen Verbindungen und/oder mit Glutardialdehyd beschichtet ist.
27. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Waschen der immobilisierten Nukleinsäuren
eine Salzlösung oder eine Pufferlösung gemäß einem der Ansprüche 4 bis 22 eingesetzt wird.
28. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Elution der Nukleinsäure eine wässrige Salz-
oder Pufferlösung eingesetzt wird.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Pufferlösung eine oder mehrere Substanz(en)
aus der Gruppe Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hy-
droxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) enthält.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lö-
sung mit einer Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter eingesetzt wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lösung mit
einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.2 Mol/Liter eingesetzt wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in einer wässrigen Lösung mit
einer Konzentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.05 Mol/Liter eingesetzt wird.
33. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung eines Alkali-
metall- oder Erdalkalimetallhalogenids eingesetzt wird.
34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung von Natrium-
chlorid, Lithiumchlorid, Kaliumchlorid oder Magnesiumdichlorid eingesetzt wird.
35. Verfahren nach Anspruch 33 oder 34, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer
Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter eingesetzt wird.
36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer Konzen-
tration in einem Bereich 0.01 bis 0.2 Mol/Liter eingesetzt wird.
37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in der wässrigen Lösung in einer Konzen-
tration in einem Bereich 0.01 bis 0.05
38. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Salzlösung eine wässrige Lösung eines Salzes
eines Alkalimetalls oder Erdalkalimetalls mit einer Carbon- oder Dicarbonsäuren eingesetzt wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Carbonsäure Essigsäure und die Dicarbonsäure
Oxalsäure ist.
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz Natriumacetat oder Natriumoxalat ist.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 38, 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen
Lösung in einer Konzentration in einem Bereich von 0.001 bis 0.5 Mol/Liter vorliegt.
42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen Lösung in einer Kon-
zentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.2 Mol/Liter, vorliegt.
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, daß das Salz in einer wässrigen Lösung in einer Kon-
zentration in einem Bereich von 0.01 bis 0.05 Mol/Liter, vorliegt.
44. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als Elutionsmittel Wasser eingesetzt wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-44, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran einen Porendurchmes-
ser von 0.05 bis 20 µm, vorzugsweise 0.2 bis 1 µm, besonders bevorzugt 0.45 bis 5.0 µm besitzt.
46. Verwendung einer Oberfläche oder einer Membran aus hydrophoben Material oder einem hydrophilen Mate-
rial, dessen Oberfläche hydrophobisiert wurde, zur Isolierung von Nukleinsäuren.
47. Verwendung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche oder die Membran aus Nylon, Po-
lylulfone, Polyethersulfone, Polycarbonate, Polyacrylate sowie Acrylsäurecopolymere, Polyurethane, Polyamide,
Polyvinylchlorid, Fluorocarbonate, Polytetrafluoroethyl, Polyvinylendifluorid, Ethylen-cotetrafluoroethylen, Poly-
ethylenchlorodifluoroethylen-Copolymerisate oder Polyphenylensulfid besteht.
48. Verwendung nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine hydrophobisierte Nylon-
Membran ist.
49. Verwendung nach einem der Ansprüche 46 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche oder Membran

DE 197 46 874 A 1

eine hydrophile Oberfläche oder Membran ist, die mit einem Hydrophobiermittel aus der Gruppe der Paraffine, Wachse, Metallseifen ggf. mit Zusätzen an Aluminium bzw. Zirkoniumsalzen, quartären organische Verbindungen, Harnstoffderivate, fettstoffmodifizierten Melaminharze, Silicone, zinkorganischen Verbindungen und/oder mit Glutarialdehyd überzogen ist.

50. Vorrichtung enthaltend eine hydrophobe Oberfläche gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eine Lösung zum Immobilisieren der Nukleinsäure und eine Waschlösung sowie ggf. eine Elutionslösung. 5

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

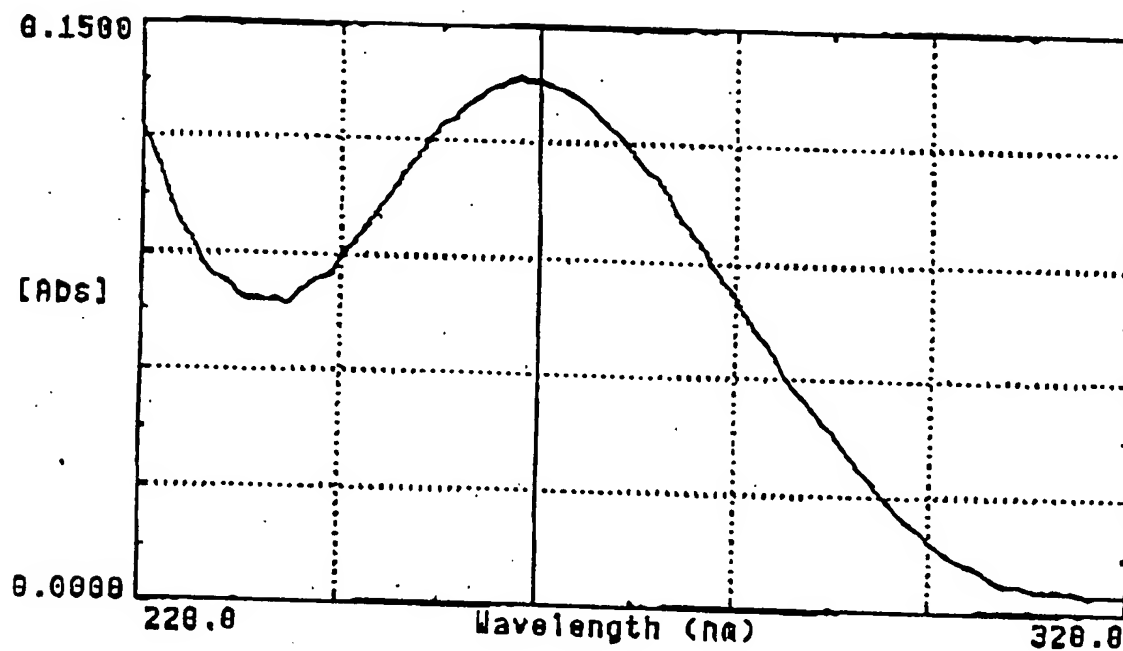


Fig. 1

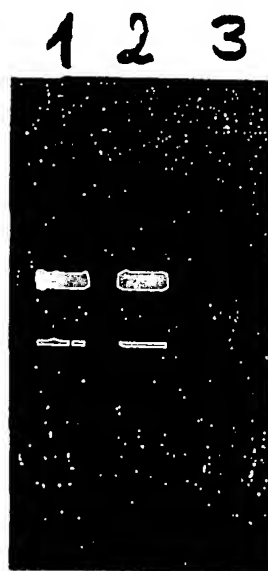


Fig. 2